

原 著

正常ヒト末梢血単核球膜表面の HSC70 蛋白質について

相良 康子 辻村 充志 小嶋英二郎
白木 洋 前田 義章
福岡県赤十字血液センター・研究部

(平成 14 年 7 月 26 日受付)

(平成 14 年 11 月 14 日受理)

71 kDa HEAT SHOCK COGNATE PROTEIN ON THE SURFACE OF HUMAN PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS

Y. Sagara M. Tsujimura E. Kojima H. Shiraki and Y. Maeda
Department of Research, Fukuoka Red Cross Blood Center

71 kDa heat shock cognate protein (HSC70) is a member of the Hsp70 family and is constitutively expressed in organisms as diverse as slime molds, bacteria, plants and higher eukaryotes. Proteins in the Hsp70 family are known as chaperones that involve quality control of cellular proteins, folding of nascent polypeptide chains and trafficking of proteins via membrane structure. Recently, it was revealed that Hsp/HSC70 proteins were presented on surface of virus- or bacteria-infected cells, immortalized cells and blood cells of autoimmune disease patients. We previously reported that the HTLV-1 receptor consists of HSC70, β -actin and phosphatidylglycerol on the surface of MOLT-4 cells. In this study, we examined the induction of HSC70 protein on the surface of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from healthy individuals. Little HSC70 protein was observed on the surface of PBMCs before cultivation. However, after 72 hours culture, $41 \pm 9.1\%$ of PBMCs presented HSC70 proteins on the cell surface. On the other hand, in culture with phytohemagglutinin (PHA), $70 \pm 14\%$ of PBMCs exposed HSC70 protein on the cell surface after 24 hours, and $84 \pm 5.0\%$ after 72 hours. PHA stimulated the presentation of HSC70 protein on the cell surface of $CD4^+$ T cells, which are the target cells of HTLV-1 in vivo, as well as that on the surface of PBMCs. Susceptibility to HTLV-1 of target cells was parallel to the expression level of HSC70 molecules on the cell surface. These results demonstrate that HSC70 protein on the surface of PBMCs and $CD4^+$ T cells exposes the domains which are functional for HTLV-1 infection, and that stimulation by cultivation and mitogen enhances the trafficking of HSC70 proteins to the surface of plasma membrane. This is the first finding that HSC70 on the surface of $CD4^+$ T cells functions as a receptor for cell-to-cell transmission of HTLV-1.

Key words : 71 kDa heat shock cognate protein, HTLV-1 receptor, flow cytometric analysis

はじめに

熱ショック蛋白質 (heat shock protein; Hsp) は、熱ショックや重金属、砒素、エタノール、活性酸素、アミノ酸誘導体等の有害物質による細胞ストレスへの応答反応の際に誘導される一群の蛋

白質として 1970 年代後半に同定された。これらの蛋白質はその機能の一つとして、ストレスにさらされた細胞内で生じる蛋白質の変性に対し、その変性した蛋白質を元の構造に戻そうとする反応を司っている^{1,2)}。正常細胞において Hsp は house-

Table 1 HSC70-presenting cells

Cells	origin	HSC70	Properties	References
CRL-1420	pancreatic carcinoma	+		4
CX +	colon carcinoma	+	ectodomain; 504 617 A.A.	5
Daudi	Burkitt lymphoma	+	ectodomain; 350 372 A.A.	6
EJ	bladder carcinoma	+		4
HeLa	adenocarcinoma	+	fusion regulatory molecule for HIV	7
MOLT-4	acute lymphoblastic leukemia	+	HTLV-1 receptor	3
W31(H-ras)	H-ras transformed fibrosarcoma	+	DNT sensitive (W31 wild; HSC70 (-) DNT resistant)	8
MA-104	embryonic kidney cell (African green monkey)	+	rotavirus receptor	9
CV-1	normal kidney cell (African green monkey)	-		4
LM(TK)	fibroblast (mouse)	-		3
NIH3T3	fibroblast (mouse)	-		4
Kidney cells	normal (biopsy)	-		10
	rejected allograft	+		10
Nerve cells	synapse membrane	+		11
	cerebellum	+		12

keeping な働きを担っており、可溶性蛋白質として細胞質に局在していると考えられていたが、近年、HSC70 蛋白質 (71 kDa 熱ショック類似蛋白質; 71 kDa heat shock cognate protein) がガン細胞や胎児由来細胞の細胞表面に提示されていることが明らかになってきており (Table 1)、我々も HTLV-1 の細胞間感染機構の解明を通して、標的細胞 MOLT-4 表面に存在する HSC70 が感染受容体として機能していることを見出した³⁾。HSC70 蛋白質のアミノ酸配列からは膜貫通構造モチーフの存在は認められない。しかしながら、HSC70 分子を中心として細胞骨格蛋白質 β アクチンおよび生体膜リン脂質の 1 種であるホスファチジルグリセロール (PG) からなる複合体が標的細胞表面に局在し、HTLV-1 感染受容体として機能している³⁾。この蛋白質 リン脂質複合体の生理学的機能とその細胞表面への提示機序について検討するため、我々は正常ヒト末梢血単核球を用いて HSC70 蛋白質の細胞表面への発現誘導を試みた。また、末梢血単核球中の CD4 陽性細胞が HTLV-1 の生体内標的細胞であることから、細胞表面に提示される HSC70 蛋白質の HTLV-1 感染受容体としての機能についても検討した。本研究により、調製直後には細胞表面にほとんど観察されなかつ

た HSC70 蛋白質が培養に伴って細胞表面に発現誘導されること、また PBMC だけでなく末梢血 CD4 陽性細胞においても HSC70 蛋白質が HTLV-1 感染受容体分子として働くことが明らかになった。

材料および方法

1. 末梢血単核球の分離ならびに T 細胞の細分画と培養

正常ヒト末梢血から調製した buffy coat 画分を Dulbecco's PBS にて希釈し、Lymphocyte Separation Medium に重層して 1,500 × g にて 20 分間遠心後、界面画分を分取した。Dulbecco's PBS を添加して懸濁し、800 × g にて 15 分間遠心し、上清を除いた。得られた沈層の細胞群を末梢血単核球 (PBMC) とした。また、EDTA 採血した正常ヒト末梢血 10ml に RosetteSep™ T Cell Enrichment Cocktail, あるいは RosetteSep™ CD4⁺ T Cell Enrichment Cocktail, Rosette™ Sep CD8⁺ T Cell Enrichment Cocktail (Veritas 社製) を各 0.5 ml 添加して不要な白血球細胞を赤血球細胞とクロスリンクさせ、リンパ球分離比重液に重層後、遠心分離した。界面に生じたリンパ球層を CD3 陽性画分 (T 細胞画分)、CD4 陽性画分ならびに CD8 陽性画分として分離した。フローサイトメト

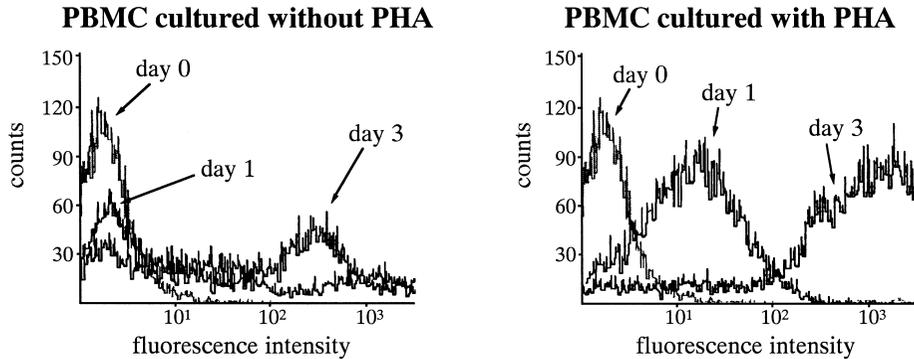


Fig. 1 Flow cytometric analysis of HSC70 protein expression on cell surface. PBMC cultured with or without PHA were examined for HSC70 protein expression on the cell surface by using anti-HSC70 specific monoclonal antibody.

リー解析において各画分中の目的の抗原陽性細胞は CD3 陽性画分 (T 細胞画分) では $97 \pm 1.2\%$, CD4 陽性画分では $95 \pm 1.5\%$, CD8 陽性画分では $92 \pm 2.1\%$ であった。上記の方法にて分離, 分画した細胞について $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ Phytohemagglutinin (PHA) および 10% FCS を含む RPMI 1640 にて培養し, 経時的に分取して以下の試験に用いた。PHA 添加の対照としては等量の 10mM PBS (pH 7.2) を用いた。

2. HSC70 蛋白質の細胞表面発現の検討

Flow Cytometry 解析法

分離直後もしくは培養中の PBMC を経時的に分取し, 1×10^6 個の細胞に対して抗 HSC70 モノクローナル抗体 (StressGen 社製 SPA-815) $10 \mu\text{g}$ を添加して 4℃ にて 1 時間反応させた後, FCM 緩衝液 [10mM PBS (pH 7.2)/1% BSA/0.1% Na-N₃] $200 \mu\text{L}$ にて 3 回洗浄した。抗 HSC70 モノクローナル抗体の HSC70 分子認識特異性については Western blot 法ならびにマスペクトロメトリー法により確認した³⁾。FITC 標識抗ラット Ig 抗体 (Biosource 社製) $1 \mu\text{g}$ を添加後, 4℃ にて 30 分間反応させた。上記同様に洗浄した後, 細胞を FCM 緩衝液 1ml に懸濁し, Cytoron Absolute (Ortho 社製) を用いて HSC70 提示細胞を検出した。

3. HTLV-1 感染実験

HSC70 の細胞表面への発現と HTLV-1 被感染

性の関連を観察するため, 培養前後の PBMC, CD3 陽性細胞, CD4 陽性細胞を経時的に分取し, Flow cytometry 解析と同時に HTLV-1 感染細胞によるシンシチウム形成試験を行った。シンシチウム形成試験においては標的細胞 1×10^5 個に対して HTLV-1 感染細胞 KT252 2.5×10^4 個を添加し, 10% FCS/0.5% human serum/RPMI 1640 中で混合培養を行った。24 時間後に細胞培養液を懸濁し, 形成されたシンシチアを 2mm グリッドシャーレを用いて顕微鏡下にて計数した。また, 混合培養時に抗 HSC70 抗体を添加することによって PBMC への HTLV-1 感染における影響を検討した。

結 果

1. 末梢血単核球細胞表面への HSC70 蛋白質の発現誘導

正常ヒト末梢血単核球 (PBMC) における HSC70 蛋白質の細胞表面への提示を観察した結果, 分離直後の PBMC 中には HSC70 表在細胞は $1.5 \pm 0.9\%$ で, ほとんど存在していなかったが, リンパ球培養用培地を用いた培養に伴って HSC70 を細胞表面に有する細胞が経時的に誘導された (Fig. 1)。さらに, Fig. 2 では由来の異なる 2 種類の PBMC について HSC70 陽性率の推移を示しているが, いずれも培養とともに HSC70 陽性率の上昇が認められた。そのうち, PBMC-2 においては PHA 無添加培養では 72 時間後の HSC70 陽性率

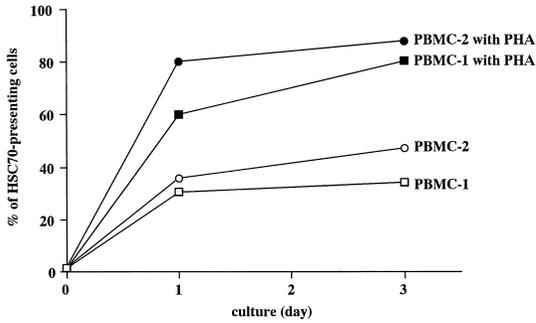


Fig. 2 Induction of HSC70 protein on cell surface.

Effect of PHA on the induction of HSC70 on the cell surface was determined. and , PBMC from buffy coat of individual # 1. and , PBMC from buffy coat of individual # 2. Open symbols, PBMCs cultured without PHA. Closed symbols, PBMCs cultured with PHA.

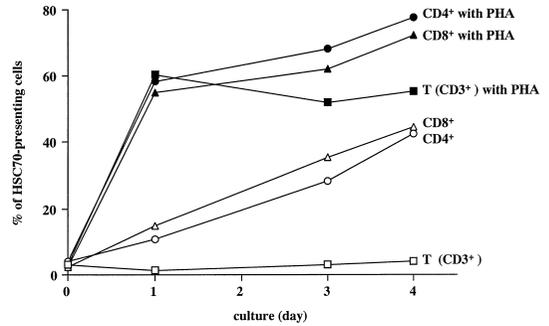


Fig. 3 Induction of cell surface HSC70 protein on T-cell subsets.

Cell surface expression of HSC70 on each T cell subset was examined by flow cytometric analysis. and , T (CD3⁺) cells. and , CD4⁺ cells. and , CD8⁺ cell. Open symbols, PBMCs cultured without PHA. Closed symbols, PBMCs cultured with PHA.

は40.8%であったのに対し、PHAを添加した場合には24時間培養で78.0%、72時間後には84.3%と細胞表面への顕著な誘導が観察された。このことはmitogenによる賦活化でHSC70の細胞表面への発現誘導が増強されることを示しており、同様の結果は実験に用いたすべてのPBMCにおいて観察された。次にPBMC中のT細胞群を分画し、各画分について培養によるHSC70蛋白質の細胞表面発現について観察した (Fig. 3)。PHA無添加培養においてはCD4陽性細胞およびCD8陽性細胞の72時間培養後のHSC70陽性率はそれぞれ28.5%、35.4%に増加していたのに対し、CD3陽性細胞では培養によるHSC70蛋白質の細胞表面への発現誘導は認められなかった。しかし、CD3陽性細胞画分においてもPHAを添加して培養することにより24時間後のHSC70陽性率は60.5%に上昇し、72時間後、96時間後での陽性率も各々51.9%、55.5%と保持され、HSC70蛋白質の細胞表面への誘導が観察された。

2. 細胞表在 HSC70 蛋白質の分子構造と機能

先に述べたように、T細胞系培養細胞株MOLT-4においては細胞表面に存在するHSC70蛋白質を中心とした蛋白質脂質複合体がHTLV-1の細胞間感染の受容体として機能している³⁾。今回、培養によってHSC70蛋白質がPBMC

細胞表面に誘導されることが明らかになったが、この誘導されたHSC70分子がMOLT-4細胞の場合と同様にHTLV-1感染受容体複合体を形成しているかどうかを観察するため、HTLV-1感染細胞との共培養による感染実験を試み、HSC70分子の細胞表面発現とHTLV-1感染性との相関について検討した。その結果をFig. 4に示す。PBMCでは調製直後 (day 0) にはHSC70陽性率は1.5%でシンシチウム形成数は 86 ± 4 であった。PHA無添加培養ではday 1でHSC70陽性率/シンシチウム形成数は33.0%/ 283 ± 46 、day 3で40.8%/ 300 ± 24 となった。一方、PHA添加培養においてはday 1で70.0%/ 844 ± 12 、day 3で84.3%/ 842 ± 52 とHSC70陽性率の増加に伴うシンシチウム数の増加が認められた。また、CD4陽性細胞では調製直後はHSC70陽性率/シンシチア形成数は4.2%/ 160 ± 21 であり、PHA無添加培養ではHSC70陽性率はday 1で10.8%/ 427 ± 24 、day 3で28.5%/ 305 ± 33 と漸増を示した。これに対し、PHA添加培養ではday 1で58.3%/ 564 ± 11 、day 3で77.5%/ 882 ± 28 と経時的に顕著な増加が観察された。一方、CD3陽性細胞では調製直後のHSC70陽性率/シンシチア形成数は2.9%/ 75 ± 11 であり、PHA無添加培養においてはday 1では1.3%/

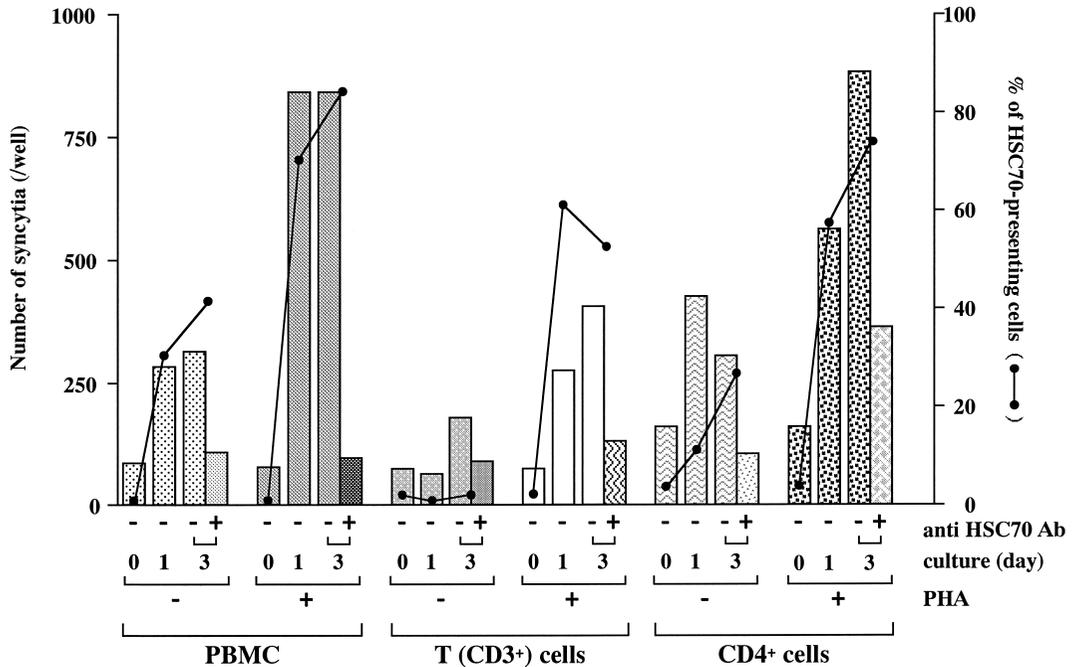


Fig. 4 Correlation between percentage of HSC70-presenting cells and number of syncytia.

PBMC, T (CD3⁺) cell and CD4⁺ cell fractions were observed for correlation between the percentage of HSC70-presenting cells and the number of syncytia induced by HTLV-1-bearing cells. Histograms represent the number of syncytia in 200 μl of culture. Percentage of HSC70-presenting cells () was determined by using flow cytometric analysis.

64 ± 17, day 3 ても 2.9%/180 ± 11 と HSC70 分子の細胞表面への誘導はみられず, シンシチウム形成数もわずかな増加にとどまった. しかし, PHA 添加培養では CD3 陽性細胞画分においても day 1 で 60.5%/274 ± 18, day 3 でも 51.9%/450 ± 22 と培養前に比べて顕著に HSC70 陽性率が増加し, それに伴ってシンシチウム形成数も増加した. このように HSC70 陽性率とシンシチウム形成数の間には正の相関 (相関係数 $r^2 = 0.887 \pm 0.1$) が認められた. なお, CD8 陽性細胞については HSC70 発現とシンシチウム形成を同時に測定するのに必要な細胞数が得られないため, 感染実験は未実施である. また, この感染実験系に抗 HSC70 モノクローナル抗体を添加したところ, すべての細胞画分ならびに培養条件においてシンシチウム形成が阻害された. PBMC の PHA 添加培養における抗 HSC

70 モノクローナル抗体の感染阻害率は 88.2 ± 5.2 % であり, CD3 陽性細胞では 50.0 ± 2.0 %, CD4 陽性細胞においても 59.0 ± 3.1 % であった. 以上の結果から, PBMC ならびに CD4 陽性細胞への HTLV-1 の感染に際しても HSC70 分子がその受容体複合体の中心を成していると考えられ, この成績はヒト末梢血での HTLV-1 感染がストレス応答により誘導された表在 HSC70 蛋白質を介して起こることを示している.

考 察

熱ショック蛋白質は原生動物や細菌から高等生物に至るまで種を越えて進化的に保存されており, 新生ポリペプチド鎖の凝集体の形成を抑制し正常な folding を助ける, いわゆる分子シャペロンとして機能することが知られている¹⁾. この分子シャペロンには Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60,

Hsp40、Hsp27等のファミリーがあり、この内のHsp70ファミリーにはストレス応答により誘導されるHsp70や構成的に発現され細胞質や核小体に局在しているHSC70、小胞体にあるBiP等が含まれる¹⁾。これらの分子の細胞内での機能については充分には解明されていないが、蛋白質のfoldingにおける分子シャペロンとしての機能の他、膜を介した蛋白質の輸送等の蛋白質の品質管理機構における役割が明らかにされつつある²⁾。しかし近年、第3の機能を示唆する報告として、不死化細胞や胎児組織由来細胞においてはその細胞表面にHSC70が提示されており、がん化や細胞増殖能の指標としての意義、さらにはHIV-1やrotavirusの感染における細胞膜上感染受容体としての役割が論じられている^{7,9)}。そこで、我々は血液細胞の採取および保存時のストレス応答を分子レベルで解析することを目的とした新たな指標のひとつとして、PBMCにおけるHSC70蛋白質の動向に着目し、その動態について解析することを試みた。

正常人から得られたPBMC画分ならびにCD3陽性細胞、CD4陽性細胞およびCD8陽性細胞についてHSC70蛋白質の細胞での挙動の変化を観察したところ、CD3陽性細胞を除くすべての細胞群においてPHA無添加培養でも緩やかなHSC70の細胞表面への提示誘導が認められた。CD3陽性細胞画分において培養によるHSC70の細胞表面への誘導が認められず、この現象がCD4陽性細胞とCD8陽性細胞の共培養で再現されたことから、CD3陽性細胞画分に何らかの誘導抑制に関わる因子または細胞の存在が推定される。それはCD4陽性細胞とCD8陽性細胞との共存によって発現もしくは活性化されると考えられ、CD4陽性細胞とCD8陽性細胞とのクロストークによって発現もしくは分泌される因子が制御に関与していると思われる(相良,未発表)。一方、PHA添加培養においてはすべての細胞画分でHSC70陽性率の顕著な増加が観察された。mitogenによる賦活化はCD3陽性細胞画分におけるHSC70提示抑制機構にも影響してその抑制を解除することを示しており、PHAによる細胞内分子移送機構への影響が

考えられる。この影響がHSC70分子に特異的なものかどうか、今後の知見が待たれる。また、PHA無添加培養におけるHSC70表在細胞の漸増は培養期間に伴う細胞の加齢または37℃保存に対する細胞表面の変化を表しており、mitogen刺激によるHSC70表在細胞誘導の増強は細胞に対する刺激やストレスが生じた場合にはHSC70提示細胞が増加することを示している。以上の結果からHSC70の細胞表面提示は細胞のストレス応答の指標になると考えられる。このことは免疫系の異常や活性化によりCD4陽性細胞とCD8陽性細胞の不均衡が生じた場合にHSC70が細胞表面に提示されることを示唆しており、細胞表在HSC70蛋白質を観察することは生体内または採取血液中の免疫系細胞の状態を表す指標となりうる。さらに、T細胞系細胞株MOLT-4において細胞表在HSC70蛋白質は細胞骨格蛋白質βアクチンおよびリン脂質ホスファチジルグリセロールとの複合体を形成してHTLV-1感染の際の受容体となることが明らかになっている^{3,13)}。正常ヒト末梢血単核球においてもHSC70陽性細胞率とHTLV-1感染効率が正の相関を示すこと、ならびに、末梢血単核球へのHTLV-1感染が抗HSC70抗体によって阻害されることからPBMCの表面に存在するHSC70蛋白質もMOLT-4細胞株の場合と同様にHTLV-1感染の際の受容体として機能していると考えられ、さらに、その存在様式についても同様にβアクチンおよびホスファチジルグリセロールとの複合体を形成してHTLV-1感染受容体構造をとっているのではないかと推定される。この複合体の生体内における生物学的機能は未知であるが、培養やmitogen刺激に対する応答という観点に立つとヒト白血球の環境応答の指標となる可能性があると考えられる。今後、このHTLV-1感染受容体複合体の生理学的意義とその提示機序の解明に伴い、細胞の保存状態あるいは採血や細菌感染等のストレスに対する応答状態とHTLV-1感染との関わりが明らかにされていくと考えられる。今回、HTLV-1感染が被感染者体内における免疫的刺激や恒常性の変動等に対する生体応答機構を利用して起こることが一部明らかとなったが、

HSC70 蛋白質の細胞内ダイナミズムは HTLV-1 の個体間ならびに個体内感染の機序をさらに解きあかす糸口になると期待される。

謝辞：本稿につきましては、投稿の機会を与えていただきました東京女子医科大学 藤井寿一先生ならびに九州大学医学部 稲葉頌一先生に深謝いたします。

文 献

- 1) Hartl, F.U. : Molecular chaperons in cellular protein folding. *Nature*, 381 : 571-579, 1996.
- 2) Wickner, S., Maurizi, M.R., Gottesman, S. : Post-translational quality control : folding, refolding, and degrading proteins. *Science*, 286 : 1888-1893, 1999.
- 3) Sagara, Y., Ishida, C., Inoue, Y., Shiraki, H., Maeda, Y. : 71-kilodalton heat shock cognate protein acts as a cellular receptor for syncytium formation induced by human T-cell lymphotropic virus type 1. *J. Virol.*, 72 : 535-541, 1998.
- 4) Tikoo, A., Shakri, R., Connolly, L., Hirokawa, Y., Shishido, T., Bowers, B., Ye, L.H., Kohama, K., Simpson R.J., Maruta, H. : Treatment of ras-induced cancers by the F-actin-bundling drug MKT-077. *Cancer J. Sci. Am.*, 6 : 162-168, 2000.
- 5) Botzler, C., Li, G., Issels, R.D., Multhoff, G. : Definition of extracellular localized epitopes of Hsp70 involved in an NK immune response. *Cell Stress Chaperones*, 3 : 6-11, 1998.
- 6) Hirai, I., Sato, N., Qi, W., Ohtani, S., Torigoe, T., Kikuchi, K. : Localization of pNT22 70 kDa heat shock cognate-like protein in the plasma membrane. *Cell Stress Funct.*, 23 : 153-158, 1998.
- 7) Suga, S., Tsurudome, M., Ohgimoto, S., Tabata, N., Watanabe, N., Nishio, M., Kawano, M., Komada, H., Ito, Y. : Identification of fusion regulatory protein (FRP)-1/4F2 related molecules : cytoskeletal proteins are associated with FRP-1 molecules that regulate multinucleated giant cell formation of monocytes and HIV-induced cell fusion. *Cell Stress Funct.*, 20 : 473-483, 1995.
- 8) Takashima, S., Sato, N., Kishi, A., Tamura, Y., Hirai, I., Torigoe, T., Yagihashi, A., Takahashi, S., Sagae, S., Kudo, R., Kikuchi, K. : Involvement of peptide antigens in the cytotoxicity between 70 kDa heat shock cognate protein-like molecule and CD3⁺, CD4⁻, CD8⁻, TCR-alpha beta-killer T cells. *J. Immunol.*, 157 : 3391-3395, 1996.
- 9) Guerrero, C.A., Bouyssounade, D., Zarate, S., Isa, P., Lopez, T., Espinosa, R., Romero, P., Mendez, E., Lopez, S., Arias, C.F. : Heat shock cognate protein 70 is involved in rotavirus cell entry. *J. Virol.*, 76 : 4096-4102, 2002.
- 10) Trieb, K., Dirnhofer, S., Krumbock, N., Blahovec, H., Sgonc, R., Margreiter, R., Feichtinger, H. : Heat shock protein expression in the transplanted human kidney. *Transpl. Int.*, 14 : 281-286, 2001.
- 11) Clay, J.R., Kuzirian, A. : Trafficking of axonal K⁺ channels : potential role of Hsc70. *J. Neurosci. Res.*, 67 : 745-752, 2002.
- 12) Sarrío, S., Casado, V., Escriche, M., Ciruela, F., Mallol, J., Canela, E.I., Lluís, C., Franco, R. : The heat shock cognate protein hsc73 assembles with A(1) adenosine receptors to form functional modules in the cell membrane. *Mol. Cell Biol.*, 20 : 5164-5174, 2000.
- 13) Sagara, Y., Inoue, Y., Kojima, E., Ishida, C., Shiraki, H., Maeda, Y. : Phosphatidylglycerol participates in syncytium formation induced by HTLV type 1-bearing cells. *AIDS Res. Hum. Retrovirus*, 17 : 125-135, 2001.